

明 細 書

肝細胞癌に関連する遺伝子

5 技術分野

本発明は、肝細胞癌に関連する遺伝子、特に肝細胞癌の再発に関連する遺伝子に関する。

背景技術

- 10 肝細胞癌のほとんどは、ウイルス性肝炎による慢性肝炎から発症する。その原因ウイルスは、C型肝炎ウイルスとB型肝炎ウイルスである。いずれも持続感染すると治療法はなく、肝硬変、肝細胞癌発症の恐怖と立ち向かうほかない。インターフェロンが肝炎治療薬として使用されているが、有効例はわずか30%であり、必ずしも十分な治療薬とはいえない。特に慢性肝炎ではほとんど有効例を見ない
- 15 のが現状である。しかし、たとえウイルスが排除できなくとも、病態の進展を抑えることができれば、肝硬変や肝細胞癌の予防につながるため、病態の進展因子を分子レベルで明らかにすることが重要となる。

- 一方、一度肝細胞癌が発生すると、外科的根治術がなされても、残肝再発は高頻度に出現する。肝癌の術後5年生存率は全国集計で51%であり、肝切除後1年
- 20 で約25%、2年で50%、5年では80%の症例で再発が起こることが報告されている。こうなると、残肝組織は正常肝組織とはいえず、すでに肝細胞癌再発の芽が存在するとも考えられる。現在、再発危険因子として、腫瘍最大径、個数、門脈腫瘍栓、術前AFP値、肝内転移、肝硬変の有無などが報告されている。しかし、肝細胞癌再発の予測および予防法を開発するには、これら危険因子にも関連する、
- 25 再発の有無を決定する因子を分子レベルでとらえる必要がある。この分子レベルの因子は、再発だけでなく、肝細胞癌発症や病態の進展そのものにも関わる因子であると考えられる。近年、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、病態を遺伝子全体の発現パターンの違いにより、より詳細に分類できるよう

になってきた。これまで癌の分類には主に組織学的、免疫学的手法が用いられてきたが、同じ型に分類された癌でも臨床経過、治療効果が症例によって異なっている。これらを詳細に分類できる手法があれば、個々に応じた治療が可能となる。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、このような癌の予後を知る上で、

5 強力な方法と考える。

今までに、肝細胞癌に関わる DNA マイクロアレイ解析では、

(i) 癌部、非癌部間において、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？

(Shirota Y, Kaneko S, Honda M, et al. Identification of differentially expressed gene in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Hepatology 2001; 33 : 832-840、

10 Xu X, Huang J, Xu Z, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. Proc. Nat. Acad. Sci. USA . 2001; 98: 15089-15094)

(ii) 癌組織の分化度において、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？

15 (Shirota Y, Kaneko S, Honda M, et al. Identification of differentially expressed gene in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Hepatology 2001; 33 : 832-840、Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : Identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. Cancer res. 2001 ; 61 : 2129- 2137)

20 (iii) B 型肝炎由来の肝細胞癌と、 C 型肝炎由来の肝細胞癌とでは、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？ (Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : Identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. Cancer res. 2001 ; 61 : 2129- 2137)

25 (iv) 肝細胞癌血管浸潤の有無により、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？ (Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : Identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. Cancer res. 2001 ; 61 : 2129-

2137)

(v) 多結節性肝細胞癌のクローン解析を行い、肝内転移癌に共通して見られる遺伝子の発現変化は何か？(Cheung S, Chen X, Guan X, et al. Identify metastasis-associated gene in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multinodular tumor. Cancer res. 2002 ; 62 : 4711- 4721)

などが明らかにされている。しかしながら、再発に関与する遺伝子に関しては、飯塚ら (Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. Lancet 2003; 361: 923-929) の癌組織での解析にとどまる。残肝組織を反映する非癌部肝組織での解析は、未だなされていない。

発明の開示

本発明は、肝細胞癌に関連する遺伝子、特に癌の再発を予知する遺伝子を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、肝細胞癌の再発を起こした症例と再発のなかった症例から遺伝子発現のプロファイルを検討した結果、肝細胞癌に関連する遺伝子を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体から total RNA を採取し、

(b) 表 1 ～ 8 に示される遺伝子の中の少なくとも 1 つ以上の遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること

を含む前記方法。

本発明においては、表 1 ～ 8 に示される遺伝子のうち、例えば PSMB8 遺伝子、RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、RPS14 遺伝子、CXCL9 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、CYP1B1 遺伝子、TNFSF10 遺伝子、NR0B2 遺伝子、MAFB 遺伝子、

BF530535 遺伝子、MRPL24 遺伝子、QPR1 遺伝子、VNN1 遺伝子及び IRS2 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子を用いることができる。あるいは、表 1 ～ 8 に示される遺伝子のうち、例えば、PZP 遺伝子、MAP3K5 遺伝子、TNFSF14 遺伝子、LMNA 遺伝子、CYP1A1 遺伝子及び IGF1BP3 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子を用いることができる。

また、内部標準遺伝子として GAPDH を用いて測定する際には、表 1 ～ 8 に示される遺伝子のうち、VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、又は PRODH 遺伝子、LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セットに含まれる各遺伝子を用いることもできる。

さらにまた、内部標準遺伝子として 18S rRNA を用いて測定する際には、表 1 ～ 8 に示される遺伝子のうち、VNN1 遺伝子、CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、又は LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子からなる遺伝子セットに含まれる各遺伝子を用いることもできる。

癌の評価は、転移の有無又は再発の有無を予測するというものである。また、癌としては、例えば肝細胞癌が挙げられる。

遺伝子の発現量の測定は、配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1 ～ 114 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組用いて、遺伝子を増幅することにより行なうことができる。あるいは、遺伝子の発現量の測定は、VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、PRODH 遺伝子、LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セット、VNN1 遺伝子、CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、並びに LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子からなる遺伝子セットからなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子セットに含まれる各遺伝子を増幅するためのプライマーの組合せを用いて、遺伝子を増幅することにより行うことができる。

(2) 配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1 ～ 114 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組含むプライマーセット。

(3) VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、PRODH 遺伝子、LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セット、VNN1 遺伝子、CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、並びに LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子からなる遺伝子セットからなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子セットに含まれる各
5 遺伝子を増幅するためのプライマーの組合せを含むプライマーセット。

(4) 表 1~8 に示されるいずれかの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

上記示される遺伝子としては、例えば RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、TNFSF10 遺伝子及び QPRT 遺伝子からなる群から選ばれ
10 る少なくとも 1 つの遺伝子が挙げられる。

または、上記示される遺伝子としては、例えば VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、PRODH 遺伝子、LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セット、VNN1 遺伝子、CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、並びに LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、
15 COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子からなる遺伝子セットからなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子セットに含まれる各遺伝子が挙げられる。

また、本発明のキットには前記プライマーセットを含めることができる。

本発明により、肝細胞癌の再発を予知するために有用な遺伝子が提供される。
20 この遺伝子の発現亢進状態を解析することで、癌を評価することができる。特に、本発明の遺伝子を用いることにより、肝細胞癌の再発を予知することができ、得られた予知情報はその後の治療方針に有用である。また、これらの遺伝子および遺伝子産物を用いて、再発予防の治療法を開発することが可能となる。

25 図面の簡単な説明

図 1 は、全遺伝子発現プロファイルより作製したサンプル系統樹を示す図である。サンプル間の発現様式の類似性で遺伝子が再配列され、さらに全遺伝子の発現様式の類似性から、サンプルが再配列されて、近縁関係が系統樹として示され

る。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

- 5 本発明は、肝細胞癌切除後の長期間のフォローアップ臨床データから、予後不良の症例群（例えば1年以内に再発して2年以内に死亡する症例群）と、予後良好の症例群（例えば4年以上再発がない症例群）とに分け、切除した肝組織に発現する遺伝子群の特徴から、予後を不良にする遺伝子又は予後を良好にする遺伝子（例えば再発促進に関わる遺伝子と再発抑制に関わる遺伝子）を同定することを
- 10 特徴とする。本発明は、臨床データをもとにして、原因ウイルス別にB型肝炎細胞癌症例とC型肝炎細胞癌症例とに分け、各々非癌部の組織及び癌部の組織から、予後の相関関係を有する遺伝子を同定するというものである。

- 本発明の遺伝子は、どの症例の、どの病態のときの、どの遺伝子を調べると、遺伝子と病態との相関関係がわかるのかについて、実際に患者から採取した組織
- 15 と病態との相関関係を解析することによって、明らかにされたものである。

1. 被検サンプルの分類

被検サンプルは、肝癌手術後の経過を観察し、再発早期群と遅延群とに分類する。

- 20 再発早期群とは、切除術後、一定期間内に再発してその後死亡する症例群を意味する。再発までの期間としては特に限定されるものではないが、例えば1年以内又は2年以内を例示することができる。死亡するまでの期間も特に限定されるものではないが、例えば、再発から1年以内、2年以内又は3年以内などが挙げられる。遅延群とは、一定期間以上（例えば3年以上、好ましくは4年以上）再
- 25 発がない症例群を意味する。

実際には51症例のstage I および stage II の肝細胞癌手術症例を対象とした。その内訳は、B型肝炎細胞癌症例が16例、C型肝炎細胞癌症例が35例を含む。これらのフォローアップ臨床データをもとに、再発早期群としてB型肝炎細胞癌症例から

2 例、C 型肝炎細胞癌症例から 3 例を、再発遅延群として B 型肝炎細胞癌症例から 2 例、C 型肝炎細胞癌症例から 3 例を選んだ。これら 10 例の非癌部および癌部組織の RNA について、以下の発現プロファイル解析を行った。

5 2. 遺伝子の解析

前記の通り分類された群の肝組織から total RNA を抽出し、各群間のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを比較する。total RNA の抽出は、市販の試薬（例えばトリゾール）を用いることにより行うことができる。発現プロファイルの検出は、例えばマイクロアレイ（アフィメトリクス社）を用いる。

- 10 さらに、本発明は、癌部のほか非癌部の組織において変動する遺伝子を解析することができる。ここで、非癌部とは、肝細胞癌切除術時に含まれる肝組織であって、癌細胞が含まれていない部分を意味する。但し、「非癌部」は必ずしも正常肝組織であるとは限らず、慢性肝炎（B 型肝炎や C 型肝炎）又は肝硬変を呈する組織も含まれる。例えば、このような組織がほとんどである B 型肝炎細胞癌症例や
- 15 C 型肝炎細胞癌症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子を解析の対象とすることができる。慢性肝炎又は肝硬変を呈する組織の場合は、壊死炎症反応や肝再生結節、脱落肝細胞を補う繊維化などが観察され、中には肝細胞癌発生に向けて予備軍となりうる細胞も存在する。従って非癌部組織にこそ予後と関係する遺伝子発現が存在すると考えられ、その遺伝子発現を指標として（例えば、
- 20 遺伝子発現の変動を解析することで）、予後（例えば再発）を予測することができる。

遺伝子発現の変動と表現型（再発、早期進行等）との相関関係から、癌を評価するための遺伝子を同定する。癌の評価とは、癌の病態や進行度に関する評価を意味し、転移の有無、再発の有無などを予測することが挙げられる。

- 25 本発明では、特に再発に関連して発現が促進又は抑制される遺伝子を提供する。再発とは、原発病巣に対する治療が完了したと判断された後に、新たな癌と考えられる病巣が肝内に出現することをいう。

3. 遺伝子の評価

同定された遺伝子について、病態進展を抑える因子として使えるか、病態モデル細胞や動物で、評価する。すなわち、(1)予後のわかっている残りの肝細胞癌症例について遺伝子発現定量解析を行い、予後と相関するか否かを検討する。

- 5 (2)肝細胞癌培養細胞株に遺伝子導入して発現させ、その細胞増殖性、悪性度の変化を、軟寒天培地下でのコロニー形成能やヌードマウスでの腫瘍形成能で評価する。(3)慢性肝炎患者より樹立した肝細胞培養株を用いて、遺伝子導入し発現させ、その細胞増殖性、悪性転換を、上記(2)の方法と同様の方法で評価する。(4)肝細胞癌発癌モデル動物の肝臓に遺伝子導入して発現させ、肝発癌までの経過で
10 評価する。

- 上記(1)において、遺伝子発現の定量解析は、例えばリアルタイム PCR により行う。すなわち、上記のように作製した total RNA に市販の逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。PCR 試薬は市販のものを用いることができ、PCR の条件も市販のプロトコールにしたがってよい。例えば、予備加熱を 95℃、10 分行ったのち、
15 95℃15 秒に続けて 60℃(または 65℃)、60 秒を 40 サイクルという条件である。対象とする内部標準遺伝子としては、例えば、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)、18S ribosomal RNA (18S rRNA)、 β -Actin、cyclophilin A、HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)、B2M (beta-2 microglobulin)、ribosomal protein L13a、ribosomal protein L4 等のハウスキーピング遺伝子を用い
20 ることができ、当業者であれば適宜選択することができる。解析方法は発現量の絶対的定量解析または相対的定量解析が採用されるが、好ましくは絶対的定量解析である。ここで、発現量の絶対的定量とは、検量線が最適となる閾値線(threshold line)を決定し、各サンプルの閾値 PCR サイクル数、threshold cycle(Ct)値を求めることにより得られるものであり、発現量の相対的発現量は、標的遺伝子の Ct 値
25 から内部標準遺伝子(例えば GAPDH)の Ct 値を差し引いた ΔCt 値で表されるものである。線形発現量の評価には、 $(2^{-\Delta Ct})$ の計算式で計算したものを用いることができる。

検量線を作成する場合には、標準試料の系列希釈を行って同時に測定したもの

(同じ反応溶液を使って、同じプレートに入れ、同時期に測定したもの)を用いてよい。

検量線より絶対発現量を換算できる場合は、標的遺伝子および内部標準遺伝子の絶対発現量を求めて、サンプルごとに標的遺伝子発現量／内部標準遺伝子発現量の比を算出することにより、評価に用いることができる。

再発遅延群および再発早期群のマイクロアレイの結果から遺伝子を選択して、上記の方法を用いて得られたリアルタイムPCRの結果がマイクロアレイの結果と一致する遺伝子のうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子を、たとえば非癌部発現亢進遺伝子と同定することができる。

10 上記のように発現亢進遺伝子と同定される遺伝子は、同定する際の実験条件によって、例えば用いる内部標準遺伝子、プライマー配列、アニーリング温度などによって、種々のものを選択することができる。また、各種の統計方法(例えば、Mann-Whitney U test)を用いて、再発までの期間と相関する遺伝子を選別することもできる。

15 本発明の遺伝子の全長配列は、以下のようにして得ることができる。すなわち、DNA データベースより検索し、既知の配列情報として得ることができる。あるいは、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーより、ハイブリダイゼーションスクリーニングにより単離する。

20 本発明において、再発が早期になかった症例(再発遅延)において発現が亢進される遺伝子としては、表1～表4に示されるものがあり、再発が早期にあった症例において発現が亢進される遺伝子としては、表5～8に示されるものがある。

表1：B型肝細胞癌症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子
(24)

表2：C型肝細胞癌症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子
25 (10)

表3：B型肝細胞癌症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (137)

表4：C型肝細胞癌症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子
(104)

表 5 : B 型肝細胞癌症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (48)

表 6 : C 型肝細胞癌症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (12)

5 表 7 : B 型肝細胞癌症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (75)

表 8 : C 型肝細胞癌症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (38)

表1 B型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (24) (BNgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	TNFSF14	
2	MMP2	
3	SAA2	B型癌遅延群
4	COL1A1	
5	COL1A2	
6	DPYSL3	
7	PPARD	
8	LUM	
9	MSTP032	
10	CRP	
11	TRIM38	
12	S100A6	
13	PZP	
14	EMP1	
15	AI590053	
16	MAP3K5	
17	TIMP1	
18	GSTM1	B型癌遅延群 C型癌遅延群
19	GSDA	
20	GSTM2	B型癌遅延群 C型癌遅延群
21	SGK	B型癌遅延群
22	LMNA	
23	MGP	
24	LTBP2	

表2 C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (10) (CNgood)

番号	遺伝子	重複グループ	
25	M10098	B型癌遅延群	C型癌遅延群
26	PSMB8		
27	RALGDS		
28	APOL3		
29	GBP1		
30	RPS14		
31	CXCL9		
32	DKFZp564F212		
33	CYP1B1		
34	TNFSF10		

表3 B型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (137) (BT_{good})

番号	遺伝子	重複グループ	
35	HP		
25	M10098	C型癌遅延群	C型非癌遅延群
36	CYP2E1		
37	HDL	C型癌遅延群	
38	GPX4		
39	G0S2		
40	HAO2		
41	ATF5	C型癌遅延群	
42	MT1F	C型癌遅延群	
43	CYP3A4	C型癌遅延群	
44	Scd		
45	SERPINA7		
46	AKR1D1		
47	AL031602		
48	TSC501		
18	GSTM1	B型非癌遅延群	C型癌遅延群
3	SAA2	B型非癌遅延群	
49	BHMT		C型癌遅延群
50	HADHSC		
51	FBXO9		
52	KIAA0442		
53	KIAA0293		C型癌遅延群
54	IGHG3		
55	ADH2		C型癌遅延群
20	GSTM2	B型非癌遅延群	C型癌遅延群
56	PPIF		
57	ALDH8A1		
58	IGLJ3		
59	HCN3		
60	ADH6		C型癌遅延群
61	AK02720		C型癌遅延群
62	NET-6		
63	CYP2D6		
64	MAFB		
65	GHR		
66	KHK		
67	ADFP		
68	LCE		
69	MPDZ		C型癌遅延群
70	TEM6		
71	KIAA0914		
72	KLKB1		
73	M11167		C型癌遅延群
21	SGK	B型非癌遅延群	
74	EHHADH		
75	MBL2		C型癌遅延群
76	APP		
77	MT1G		
78	TPD52L1		C型癌遅延群
79	CXCL10		
80	AI972416		
81	FCGR2B		
82	IGL@		
83	FLJ10134		
84	PPAP2B		
85	CDC42		
86	HBA2		
87	CYP1A2		C型癌遅延群
88	CYP2B6		
89	DKFZP586B1621		
90	MTP		
91	X07868		
92	RNAHP		C型癌遅延群
93	HLF		C型癌遅延群
94	PPP1R3C		
95	CDC2L2		
96	NRIP1		
97	GPD1		

(表3の続き)

番号	遺伝子	重複グループ
98	KIAA1053	
99	CCL19	
100	GRI1	
101	THBS1	C型癌遅延群
102	SLC5A3	
103	GADD45B	
104	AGL	
105	ADK	
106	IGKC	
107	CYP2A6	C型癌遅延群
108	GADD45A	C型癌遅延群
109	FLJ20701	
110	LOC57826	
111	SLC2A2	
112	CIRBP	
113	CGI-26	
114	DEFB1	
115	HMGCS1	
116	ODC1	
117	GLUL	B型非癌早期群 C型癌遅延群
118	CYP27A1	
119	SULT2A1	C型癌遅延群
120	AK024828	
121	PHLDA1	
122	NR1I2	
123	MSRA	
124	RNASE4	
125	AI339732	
126	HBA2	
127	AL050025	
128	CSAD	
129	SID6-306	
130	NM024561	
131	BCKDK	
132	SLC6A1	
133	CG018	
134	GNE	
135	CKLFSF6	
136	COMT	
137	AL135960	
138	KIAA0179	
139	c-maf	
140	OSBPL11	
141	R06655	C型癌遅延群
142	KIAA04461	
143	IGF1	C型癌遅延群
144	HBA1	
145	LOC55908	
146	ENPEP	
147	TXNIP	
148	KIAA0624	
149	ENPP1	
150	CYP4F3	
151	CAV2	
152	BE908931	
153	LECT2	
154	MLLT2	
155	FLR1	
156	TF	
157	DAO	
158	AI620911	
159	GBP1	
160	UGP2	
161	GADD45B	
162	SC4MOL	
163	BE908931	
164	TUBB	
165	EPHX2	
166	SORD	

表4 C型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (104) (CTgood)

番号	遺伝子	重複グループ
167	LEAP-1	
168	PPD	
37	HDL	B型癌遅延群
43	CYP3A4	B型癌遅延群
107	CYP2A6	B型癌遅延群
25	M10098	C型非癌遅延群 B型癌遅延群
169	RACE	
170	SLC27A5	
171	FLJ20581	
172	FLJ10851	
53	KIAA0293	B型癌遅延群
173	C9	
174	AL354872	
175	AKR1C1	
176	PCK1	
18	GSTM1	B型癌遅延群 B型非癌遅延群
87	CYP1A2	B型癌遅延群
177	ANGPTL4	
178	AOX1	
179	SDS	
20	GSTM2	B型癌遅延群 B型非癌遅延群
73	M11167	B型癌遅延群
180	CYP2C9	
181	SIPL	
182	GLYAT	
75	MBL2	B型癌遅延群
183	CYP1A1	
184	CRP	
141	R06655	B型癌遅延群
185	ACADL	
93	HLF	B型癌遅延群
186	NR1I3	
187	CA2	
188	CYP2C8	
189	PON1	
55	ADH2	B型癌遅延群
92	RNAHP	B型癌遅延群
190	AQP9	
119	SULT2A1	B型癌遅延群
191	SPP1	
192	KIAA0934	
193	AKAP12	
194	APOF	
195	FMO3	
196	SLC22A1	
197	DCXR	
198	CYP3A7	
199	SOCS2	

(表4の続き)

番号	遺伝子	重複グループ
101	THBS1	B型癌遅延群
41	ATF5	B型癌遅延群
200	BCRP	
60	ADH6	B型癌遅延群
201	humNRDR	
202	GADD45G	
203	SRD5A1	
204	ABCA8	
61	AK026720	B型癌遅延群
205	APOC4	
206	FTHFD	
207	ISG15	
208	IGFBP2	
49	BHMT	B型癌遅延群
209	DNASE1L3	
210	SRD5A1	
211	E2IG4	
212	COL1A2	
213	C20orf46	
214	ESR1	
215	BLVRB	
216	LRP16	
217	SLC1A1	
218	ABCB6	
69	MPDZ	B型癌遅延群
219	FBP1	
220	ALAS1	
221	IFIT1	
222	PPARGC1	
223	Id-1H	
224	RBP1	
225	CSHMT	
226	LOC155066	
42	MT1F	B型癌遅延群
227	AGXT2L1	
228	TIMM17A	
229	SEC14L2	
230	MAOA	
231	MYC	
232	ACAA2	
233	AL109671	
234	ABCA6	
143	IGF1	B型癌遅延群
235	GRHPR	
236	HADH2	
237	AFM	
238	COL1A1	
239	MTHFD1	
240	NMT2	
108	GADD45A	B型癌遅延群
241	UGT2B15	
242	AR	
78	TPD52L1	B型癌遅延群
243	sMAP	
117	GLUL	B型非癌早期群 B型癌遅延群
244	dJ657E11.4	

表5 B型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (48) (BNbad)

番号	遺伝子	重複グループ	
245	CTH	B型癌早期群	
246	OAT		
247	PRODH	B型癌早期群	
248	CYP3A7		
249	DDT	B型癌早期群	
250	PGRMC1		
251	AKR1C1		
252	HGD	B型癌早期群	
253	FHR-4		
254	AL354872		
255	FST	B型癌早期群	
256	COX4		
257	APP		
258	PSPHL		
259	CYP1A1		
260	ZNF216		
261	LEPR	B型癌早期群	
262	TOM1L1		
263	PECR		
264	ALDH7A1		
265	GNMT		
266	OATP-C		
267	AKR1B10	C型非癌早期群	B型癌早期群
268	ANGPTL3		
269	AASS		
270	CALR		
271	BAAT		
272	PMM1		
273	RAB-R		
117	GLUL	C型癌遅延群	B型癌遅延群
274	CSHMT		
275	UGT1A3		
276	HSPG1		
277	QPRT	C型非癌早期群	
278	DEPP		
279	CA2	B型癌早期群	
280	FTHFD		
281	LAMP1		
282	FKBP1A		
283	BNIP3		
284	MAP3K12		
285	ASS	B型癌早期群	
286	ACTB		
287	PLAB	B型癌早期群	
288	ENO1L1		
289	IGFBP3		
290	UK114		
291	ERF-1		

表6 C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (12) (CNbad)

番号	遺伝子	重複グループ
292	ALB	
293	NR0B2	
267	AKR1B10	B型非癌早期群 B型癌早期群
294	MAFB	
295	BF530535	
296	MRPL24	
297	DSIP1	
277	QPRT	B型非癌早期群
298	VNN1	
299	IRS2	
300	FMO5	
301	DCN	

表7 B型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (75) (BTbad)

番号	遺伝子	重複グループ
247	PRODH	B型非癌早期群
302	PLA2G2A	C型癌早期群
303	SDS	
304	LGALS3BP	
305	BACE2	
261	LEPR	B型非癌早期群
306	RCN1	
307	MRC1	
308	TM4SF5	
309	NK4	
310	PABL	
311	IGFBP2	
312	GRINA	
313	IFI27	
314	GP2	
315	GA	
316	P4HA2	
317	KYNU	
318	PCK1	
319	UQBP	
320	HLA-DRB1	
252	HGD	B型非癌早期群
321	HTATIP2	
322	GGT1	
323	CTSH	
324	MVP	
325	SLC22A1L	
326	GMNN	
327	COM1	
328	TM7SF2	
245	CTH	B型非癌早期群
329	KDEL3	
330	VPS28	
279	CA2	B型非癌早期群
331	SFN	
332	NM023948	
333	OPLAH	

(表7の続き)

番号	遺伝子	重複グループ		
334	DGCR6			
335	INSIG1			
267	AKR1B10	B型非癌早期群		C型非癌早期群
336	PTGDS		C型癌早期群	
337	SLC25A15			
338	SEPW1			
339	CD9			
340	UQCRB			
285	ASS	B型非癌早期群		
341	CPT1A			
287	PLAB	B型非癌早期群		
342	GPAA1			
343	HF1			
344	GPX2			
345	COPEB			
346	NDRG1			
347	SYNGR2			
348	GOT1			
349	POLR2K			
350	AATF			
255	FST	B型非癌早期群		
351	OAZIN			
352	RPL7			
353	KIAA0128			
354	CLDN7			
355	ABCB6			
356	GK			
357	LU		C型癌早期群	
358	TNFSF4			
359	OSBPL9			
360	GSN			
361	LGALS4			
249	DDT	B型非癌早期群		
362	EIF3S3			
363	SLC12A2			
364	RAMP1			
365	HSPB1			
366	AI201594			

表8 C型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (38) (CTbad)

番号	遺伝子	重複グループ
367	BL34	
368	AL022324	
369	IGHM	
370	TXNIP	
371	FSTL3	
372	AW978896	
373	NM018687	
374	L48784	
375	AJ275355	
376	PER1	
377	CYBA	
302	PLA2G2A	B型癌早期群
378	SGK	
379	FKBP11	
380	AI912086	
381	IGLJ3	
382	IGKC	
336	PTGDS	B型癌早期群
383	M20812	
384	AGRN	
385	IL2RG	
386	X07868	
387	PKM2	
388	FGFR3	
389	TRB@	
390	TNFAIP3	
391	TTC3	
392	LPA	
393	AL049987	
394	IER5	
395	BSG	
396	TM4SF3	
397	HMGB2	
357	LU	B型癌早期群
398	CCL19	
399	PAM	
400	PIK3R1	
401	RANGAP1	

ただし、表5中、「CTH」と「AL354872」は同じタンパク質をコードする遺伝子である。

- 5 上記遺伝子は、単独で、又は適宜組み合わせで癌の評価用キットに含めることができる。遺伝子を組み合わせで遺伝子セットとしては、例えば、表16（後述）

を挙げることができる。上記遺伝子はその一部の配列であってもよい。これらの遺伝子は、表に記載の遺伝子発現を検出するためのプローブとして使用することができる。

また、本発明のキットには、遺伝子増幅用プライマー、緩衝液、ポリメラーゼ
5 等を含めてもよい。

遺伝子増幅用プライマーは、各遺伝子配列の DNA 配列および mRNA 配列をデータベースより得、特に variant の有無、エキソンイントロン構造を含めた情報も得るようにして、翻訳領域に当たる部分で共通な配列をターゲットとする。なるべく片側プライマーは隣接エキソンにまたがるようにして、mRNA だけが検出さ
10 れるように設計する。あるいは、web software「Primer3」(provided by Steve Rozen and Whitehead Institute for Biomedical Research) を用いてプライマーの設計候補を得、さらに BLAST (NCBI) search でホモロジー検索を行い、類似配列へのミスマッチをさけるようなプライマーを選択する。

好ましいプライマーの配列番号を一般式 $2n-1$ 及び $2n$ (n は 1 ~ 114 の整数を表
15 わす) に示す。本発明においては、 $2n-1$ により示されるプライマーと $2n$ により示されるプライマーとを 1 組のセットとして用いることができる。例えば、 n を 1 とすると、配列番号 1 と配列番号 2 のプライマーを 1 組のプライマーセットを、 n を 2 とすると、配列番号 3 と配列番号 4 のプライマーのセットを使用することができる。特に好ましいプライマーは、 n が 2、4、7、9、17 で示される場合
20 である。

その他、上記 (1) において、遺伝子発現の定量解析をイムノドットプロットや免疫染色等で行うことも可能である。イムノドットプロットや免疫染色は、表 1 ~ 8 に示した遺伝子の発現産物に対する抗体を用い、定法にしたがって行うことができる。その際、市販されている抗体を利用しても良いし、マウス、ラット、
25 ウサギ等の動物に免疫することで得られる抗体を利用しても良い。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例 1

肝細胞癌症例中の発現亢進遺伝子の検出

以下のように、B型およびC型肝炎細胞癌症例のヒト肝組織を用いて、肝細胞癌

5 再発抑制分子の同定を遺伝子レベルで進めた。

肝細胞癌術後の再発機構を知り、再発の有無を予測できる遺伝子を決めるため、再発時期の異なる症例を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行った。TNM 分類で stage I、II の 51 症例を対象とした。術後 4 年以上再発のない 5 例と、術後 1 年以内に再発した 5 例を選び、Affymetrix 社 HG-U133A アレイで発現解析を行な

10 った。

凍結保存した組織に TRIzol reagent(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を加えて、ポリトロンにてホモジネートした。ホモジネート液にクロロホルムを加えてよく混和し遠心した。遠心後、上層を回収し、イソプロパノールを等量加えて、total RNA 沈殿を遠心にて回収した。

15 B型肝炎細胞癌症例（原因ウイルスがB型肝炎ウイルスである肝細胞癌症例）の再発早期群 2 例の非癌部と癌部、再発遅延群 2 例の非癌部と癌部、C型肝炎細胞癌症例（原因ウイルスがC型肝炎ウイルスである肝細胞癌症例）の再発早期群 3 例の非癌部と癌部、再発遅延群 3 例の非癌部と癌部、合計 8 群に分け、発現解析を行った。

20 各サンプル群につき 15 μ g の total RNA を用意し、Affymetrix 社 GeneChip Expression Analysis Technical Manual に基づいて、ピオチン標識 cRNA を合成した。T7-(dt)₂₄ プライマーと Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen Life Technology) を用いて、1 時間反応させ第一鎖 cDNA を合成した。その後、E. coli DNA リガーゼ、E. coli DNA ポリメラーゼ、E. coli RNase H を加え 16℃ 2 時間反応させ、

25 最後に T4 DNA ポリメラーゼを加えて二本鎖 cDNA を合成した。クリーンアップを行った後、BioArray high yield RNA transcript labeling kit (Affymetrix, Inc, CA) を用いて、37℃ 4 時間 in vitro 転写し、ピオチン標識 cRNA を合成した。Technical manual に基づき、ハイブリダイゼーションプローブ溶液を作製し、プレハイブリ

ダイゼーションを 45°C 45 分間行った GeneChip HG-U133A (Affymetrix, Inc, CA ; 22283 個のヒト遺伝子が含まれている)に加え、ハイブリダイゼーションを 45°C 16 時間行った。その後、GeneChip Fluidics Station 400(Affymetrix, Inc, CA)を用いて洗浄した後、ストレプトアビジンフィコエリスリンとビオチン化抗ストレプト
5 アビジンにて染色を行った。その後、HP GeneArray スキャナー (Affymetrix, Inc, CA)にてスキャンを行った。

データ解析は、GeneSpring ver.5.0 (SiliconGenetics, Redwood, CA)を用いて行った。normalization 後、内在性定量用コントロール遺伝子 BioB のシグナルを検出限界(細胞あたり数コピーに相当する)として参考にし、100 以上の輝度をもち、な
10 おかつ、シグナルフラッグが最低 1 チップでも present の遺伝子を対象とした。7444 遺伝子が対象となり、非癌部では再発早期群/遅延群間で 2.5 倍以上差のある遺伝子を同定した。癌部では 3 倍以上差のある遺伝子を同定した。

その結果、絞り込んだ 7444 遺伝子で、再発なし/ありの非癌部間で 2.5 倍以上差のある遺伝子は、up34 個と down58 個、癌部間で 3 倍以上差のある遺伝子は、
15 up215 個と down110 個であった。これらの中で B 型/C 型共通に再発なしで発現亢進する遺伝子は、非癌部で 0 個、癌部で 26 個であった。一方、B 型/C 型共通に再発ありで発現亢進する遺伝子は、非癌部で 2 個、癌部で 3 個であった。また、癌部/非癌部共通に発現亢進する遺伝子があり、再発なしで 5 個、再発ありで 10 個であった。(表 9)。

20 なお、表 9 において合計が 401 となっているが、これは GLUL の重複が特別なものであるため 402 ではなく 401 である。

表9 肝細胞癌再発に関わる遺伝子

	再発遅延群で発現亢進		再発早期群で発現亢進		共通
	非癌部	癌部	非癌部	癌部	
B型肝炎	24	137	48	75	4 10
C型肝炎	10	104	12	38	1 0
共通	0	26	2	3	
合計	34	215	58	110	244 158

合 計 401

表9の結果より、再発予後の違いは、非癌部より癌部のほうに遺伝子発現変化が大きく、C型肝細胞癌症例よりはB型肝細胞癌症例の方が遺伝子発現の差が大きいと言える。また、原因ウイルスとは無関係に共通して再発予後に関わる遺伝子が、見つかる場合があるが、意外に少ない。発癌と同様、再発も原因ウイルス別に異なる機構が関与していると考えられる。

サンプル系統樹解析では、全遺伝子の発現プロファイルから、まず非癌部と癌部に分かれ、各々非癌部と癌部は、再発予後ではなく、原因ウイルスによる近縁関係が観察された(図1)。図1において、各試験群を示す「BNbad」、「BNgood」などの表記において、第1番目のアルファベットはウイルスの種類を示し、「B」はB型肝炎ウイルス、「C」はC型肝炎ウイルスを意味する。第2番目のアルファベットの「N」は非癌部、「T」は癌部を意味する。そして「bad」は再発早期、「good」は再発遅延を意味する。

このことは、再発予後に影響する遺伝子発現は、限られた遺伝子の発現変化でもたらされるものと考えられる。

以上のことから、再発の機構解明や有無を予測できる候補遺伝子が見出された(表1～8)。

実施例2

5 C型肝細胞癌症例における各群の遺伝子の再発期間と発現量の相関の検討

以下のとおり、C型肝細胞癌症例のうち、再発遅延群と再発早期群各々の非癌部において発現亢進する遺伝子について、再発までの期間と発現量との相関を検討した。

10 遺伝子発現プロファイル解析に用いたC型肝細胞癌症例6例を含め、計22例の非癌部のサンプルを対象とした。各症例の臨床病理学的知見と再発までの期間(再発なしの期間)を表10Aに示す。

表10A C型肝細胞癌症例

症例番号	性別	年齢	非癌部	stage	再発なしの月数	マイクロアレイ
59	M	66	CH	I	84	遅延群
18	M	68	LC	I	58	遅延群
6	M	65	CH	II	51	遅延群
25	M	51	CH	I	45	
29	M	70	CH	II	43	
12	M	66	CH	II	41	
4	M	65	CH	I	40	
48	F	65	LC	I	39	
31	M	60	LC	I or II	38	
16	M	70	CH	I	37	
22	M	65	CH	I	34	
3	F	71	LC	I	29	
65	M	60	LC	I	29	
30	F	62	LC	II	28	
10	M	56	LC	I	26	
23	M	62	CH	II	16	
26	M	70	LC	I	16	
14	M	62	CH	II	14	早期群
62	M	66	LC	I	13	
17	M	54	LC	I	12	
15	F	68	LC	II	8	早期群
44	M	58	CH	I	4	早期群

CH: 慢性肝炎、LC: 肝硬変

症例31のstageは、未決定。

再発なしの月数とは、再発までの月数の他、調査期間中再発がみられないものも含む。

また、追跡調査により表 10A に示す症例を変更又は更新し、さらに、本実施例の対象として症例を追加した計 35 例についての、臨床病理学的知見と再発までの期間（再発なしの期間）を表 10B に示す。

5

表10B C型肝炎細胞癌症例

症例番号	性別	年齢	非癌部	stage	再発なしの月数	マイクロアレイ
59	M	66	CH	I	>94	遅延群
6	M	65	CH	II	65	遅延群
25	M	51	CH	I	> 58	
18	M	68	LC	I	58	遅延群
12	M	66	CH	II	41	
4	M	65	CH	I	>40	
29	M	70	CH	II	39	
16	M	70	CH	I	>37	
48	F	65	LC	I	37	
31	M	60	LC	I	37	
80	M	73	CH	II	34	
22	M	65	CH	I	33	
3	F	71	LC	I	29	
65	M	60	LC	I	28	
30	F	62	LC	II	26	
10	M	56	LC	I	25	
70	M	57	LC	II	24	
79	M	73	LC	I	22	
73	M	50	CH	II	20	
81	F	69	LC	I	17	
26	M	70	LC	I	16	
72	M	71	LC	II	16	
69	M	66	LC	II	15	
14	M	62	CH	II	14	早期群
78	F	66	CH	I	13	
82	M	71	CH	I	13	
17	M	54	LC	I	12	
71	M	57	LC	II	12	
77	F	65	LC	I	10	
62	M	66	LC	I	9	
74	M	67	CH	II	9	
15	F	68	LC	II	8	早期群
76	M	72	NL	I	7	
75	M	65	CH	II	6	
44	M	58	CH	I	4	早期群

CH: 慢性肝炎、LC: 肝硬変、NL: 正常肝
再発なしの月数とは、再発までの月数の他、
調査時点で未だ再発がみられないものも含む。

表 2 における再発遅延群の非癌部において発現亢進する遺伝子 (CNgood) の

9 個、及び表 6 における再発早期群の非癌部において発現亢進する遺伝子 (CNbad) の 12 個の、合計 21 個の遺伝子に関して、再発期間と発現量との関係を検討した。

5 まず、各症例非癌部肝組織から、上記実施例 1 と同様の方法で total RNA を抽出した。

total RNA 中に混在する DNA の影響を除去するため、DNase I (DNase I (TAKARA SHUZO, Kyoto, Japan) で 37℃、20 分処理した後、TRIzol reagent で再精製した。10 µg の total RNA を用いて 25 unit の AMV reverse transcriptase XL(TAKARA)と 250 pmol の 9-mer ランダムプライマーを含む 100 µl の反応液に
0 より逆転写反応を行った。

リアルタイム PCR には、合成 cDNA を各々 0.25~50ng 相当ずつ用いて行った。SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) の 25 µl の反応溶液を用いて ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) により、予備加熱を 95℃、10 分行ったのち、95℃ 15 秒に続けて 60℃ (または 65℃)、60 秒を 40 ないし 45 サイクルという条件で PCR を行った。
5

各サンプルの内部標準遺伝子として、glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) 又は 18S rRNA を用いて相対的定量解析、および一部は絶対的定量解析を行った。標準試料の系列希釈を行って同時に測定したものを検量線作成に用いた。検量線が最適となる閾値線 (threshold line) を決定し、各
0 サンプルの閾値 PCR サイクル数、threshold cycle(Ct)値を求めた。標的遺伝子の Ct 値から GAPDH 又は 18S rRNA の Ct 値を差し引いた ΔCt 値を求め、これをその標的遺伝子の相対的発現量とした。さらに、 $2^{-\Delta Ct}$ の計算式で計算したものを、線形発現量の評価に用いた。

一方、検量線より絶対発現量を換算できる遺伝子については、標的遺伝子および内部標準遺伝子の絶対発現量を求め、サンプルごとに標的遺伝子発現量/内部標準遺伝子発現量の比を算出して評価に用いた。測定はすべて duplicate で行った。
5

表 1 1 A、表 1 1 B、表 1 2 A および表 1 2 B において、「マイクロアレイと一致」とは、マイクロアレイ解析に用いた 6 例 (表 1 0 A 又は B の症例番号 59、18、

6、14、15、44) の定量 PCR の結果から、再発遅延群 (症例番号 59、18、6) と早期群 (症例番号 14、15、44) との比を求め、1.5 以上であったものが、実施例 1 のマイクロアレイの結果と一致としたことを意味し、一致したものについて「○」を付した。なお、上記比は 1.5 以上、好ましくは 2 以上であることが好ましい。「○」に隣接するかっこ内の数字は比の値 (3 例の平均値の比) を示す。「マイクロアレイと一致」の欄の「×」はマイクロアレイの結果と不一致なものを示す。「××」は、マイクロアレイの結果とは逆相関したものを示す。

表 1 1 A、表 1 1 B、表 1 2 A および表 1 2 B において、「相関」とは、22 症例又は再発月数が確定している 31 症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で、相関を意味し、有意に相関を示した場合に○あるいは r 値を示し、さらに p 値を記載した。

表 1 1 B および表 1 2 B において、「2 群間の有意差」の欄に、24 ヶ月以内再発 19 症例と 40 ヶ月以上再発のない 6 症例 (表 1 1 B、表 1 2 B「2 群間の有意差」欄上段) もしくは 58 ヶ月以上再発のない 4 症例 (表 1 1 B、表 1 2 B「2 群間の有意差」欄下段) との間で、有意に発現量の違いのあったものについて、p 値 (Mann-Whitney U test) を示した。

試験に用いたプライマー配列 (センス鎖 (順)、アンチセンス鎖 (逆)) を表 1 1 A、表 1 1 B、表 1 2 A および表 1 2 B に示す (配列番号 1 ~ 88)。

C 型肝細胞癌症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子候補 (CNgood) の 9 個を解析した結果を表 1 1 A 及び表 1 1 B に示す。表 1 1 A は、表 1 0 A に示す症例を対象に、内部標準遺伝子に GAPDH を用いて表 1 1 A に示す条件で定量 PCR を行った解析結果を示す。

表11A 「C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順／逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致	相関
26	PSMB8	順	AGACTGTCAGTACTGGGAGC	1	60°C	O(2.52)	
		逆	GTCCAGGACCCTTCTTATCC	2			
27	RALGDS	順	GACGTGGGAAGACGTTTCCA	3	60°C	O(4.13)	O(p=0.0118)
		逆	TGGATGATGCCCGTCTCCTT	4			
28	APOL3	順	AATTGCCCAGGGATGAGGCA	5	60°C	O(2.89)	
		逆	TGGACTCCTGGATCTTCCTC	6			
29	GBP1	順	GAGAACTCAGCTGCAGTGCA	7	65°C	O(6.00)	O(p=0.0031)
		逆	TTCTAGCTGGGCCGCTAACT	8			
30	RPS14	順	GACGTGCAGAAATGGCACCT	9	60°C	× (0.96)	
		逆	CAGTCACACGGCAGATGGTT	10			
31	CXCL9	順	CCTGCATCAGCACCAACCAA	11	65°C	O(11.5)	
		逆	TGGCTGACCTGTTTCTCCCA	12			
32	DKFZp564F212	順	CCACATCCACCACTAGACAC	13	60°C	O(4.75)	O(p=0.0541)
		逆	TGACAGATGTCCTCTGAGGC	14			
33	CYP1B1	順	CCTCTTCACCAGGTATCCTG	15	60°C	O(2.33)	
		逆	CCACAGTGTCTTGGGAATG	16			
34	TNFSF10	順	GCTGAAGCAGATGCAGGACA	17	60°C	O(2.50)	O(p=0.0424)
		逆	CTAACGAGCTGACGGAGTTG	18			

マイクロアレイと一致とは、マイクロアレイ解析に用いた6例の定量PCRの結果から、

再発遅延群／早期群の比を求め、1.5以上であったものを○とした。

相関とは、22症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で、相関を示したもののについて、○で示し、p値を記載した。

その結果、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は8個であり、そのうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子は4個(RALGDS、GBP1、DKFZp564F212、TNFSF10)であった。

- 5 同様に、表11Bは、表10Bに示す症例を対象に、内部標準遺伝子にGAPDH又は18S rRNAを用いて表11Bに示す遺伝子10個を、表中の条件で定量PCRを行った解析結果を示す。

表11B 「C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順／逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致 GAPDH補正	マイクロアレイと一致 18S rRNA補正	相関(GAPDH)	相関(18S rRNA)	2群間有意差 (GAPDH)	2群間有意差 (18S rRNA)
1	M10088	順	GGAGGTTGGAAGACGATCAG	19	65°C	× × (0.60)	-				
		逆	GTGGTGCCCTTCCGTCAATT	20							
2	PSMB8	順	AGACTGTCAGTACTGGGAGC	21	60°C	O(1.92)	O(3.60)		r=0.421 (p=0.0177)		
		逆	GTCCAGGACCCTTCTTATCC	22					r=0.377 (p=0.0361)		
3	RALGDS	順	GTGTGGCCCAACTGTGTCATC	23	65°C	O(6.71)	O(8.23)			0.0314	
		逆	CTTCAGACCGTGGATGGAGT	24							
4	APOL3	順	AATTGCCCAGGGATGAGGCA	25	60°C	O(1.85)	O(2.13)				
		逆	TGGACTCCTGGATCTTCCTC	26							
5	GBP1	順	AACAAGCTGGCTGGAAAGAA	27	65°C	O(5.87)	O(5.76)	r=0.358 (p=0.0468)	r=0.374 (p=0.0377)		
		逆	GTACACGAAGTGCTGCTCA	28				r=0.383 (p=0.0328)	r=0.458 (p=0.0089)		0.0357
6	RPS14	順	GACGTGCAGAAATGGCACCT	29	60°C	O(2.02)	O(3.35)	r=0.382 (p=0.0282)	r=0.437 (p=0.0132)		
		逆	CAGTCACACGGCAGATGGTT	30					r=0.501 (p=0.0036)	0.0485	0.0075
7	CXCL9	順	CCTGCATCAGCACCAACCAA	31	65°C	O(14.3)	O(12.5)	r=0.424 (p=0.0187)	r=0.553 (p=0.001)	0.0045	0.0042
		逆	TGGGCAAGTGAGGCTCTCTT	32				r=0.460 (p=0.0085)	r=0.603 (p=0.0002)	0.0062	0.0426
8	DKFZp564F212	順	GTGAGGATCACTGGTATCGC	33	60°C	O(4.69)	O(8.40)				
		逆	GTGAGGATCACTGGTATCGC	34							
9	CYP1B1	順	GACCCCGAGTCTCAATCTCA	35	65°C	O(4.28)	O(4.78)				
		逆	AGTCTCTTGGCGTGTGAGT	36							
10	TNFSF10	順	GCTGAAGCAGATGCAGGACA	37	60°C	O(3.71)	O(4.54)				
		逆	CTAACGAGCTGACGGAGTTG	38							
	GAPDH	順	GGTGGGAGTCAACGGATTTC	39	60°C						
		逆	GGATCTCGGCTCCTGGAAGAT	40							

定量PCRによる各遺伝子の発現量は、GAPDHをコントロール遺伝子として用い、その発現量に対する相対値で評価した。

マイクロアレイと一致とは、マイクロアレイ解析に用いた6例の定量PCRの結果から、再発遅延群／早期群の比を求め、1.5以上であったものを○とした。

相関とは、再発月数が確定している31症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で相関を示したもののについて、r値とp値を記載した。

2群間の有意差とは、24ヶ月以内再発18症例と40ヶ月以上もしくは58ヶ月以上再発のない6症例(上段)もしくは4症例(下段)との間で、

有意に発現量の違いのあったものについて、p値(Mann-Whitney U test)を示した。

その結果、発現亢進する遺伝子候補 9 個のうち、GAPDH を内部標準遺伝子に用いたときには、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は 9 個全てであり、そのうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子は 5 個であった。さらに、上記候補遺伝子 9 個のうち、18srRNA を内部標準遺伝子に用いたときにも、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は 9 個全てであり、そのうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子は 8 個であった。

再発遅延群と早期再発群の 2 群間有意差検定を行った結果、有意に差のあった遺伝子は、標準遺伝子に GAPDH を用いたときは 3 個であり、18S rRNA を用いたときは 5 個であった。

次に、C 型肝炎細胞癌症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子候補 (CNbad) の 12 個を解析した結果を表 12A 及び表 12B に示す。表 12A は、表 10A に示す症例を対象に、内部標準遺伝子に GAPDH を用いて表 12A に示す条件で定量 PCR を行った解析結果を示す。

表12A 「C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順／逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致	相関
292	ALB	順	CAAAGCATGGGCAGTAGCTC	41	60°C	○(2.19)	
		逆	CAAGCAGATCTCCATGGCAG	42			
293	NR0B2	順	TCTTCAACCCCGATGTGCCA	43	60°C	○(1.48)	
		逆	AGGCTGGTCGGAATGGACTT	44			
267	AKR1B10	順	CTTGGAAGTCTCCTCTTGGC	45	60°C	○(2.44)	
		逆	ATGAACAGGTCTCCCGCTT	46			
294	MAFB	順	ACCATCATCACCAAGCGTCG	47	60°C	○(1.56)	
		逆	TCACCTCGTCCTTGGTGAAG	48			
295	BF530535	順	GTCGCCTCACCATCTGTACA	49	65°C	○(3.74)	
		逆	CTGGAGGACAGCTGCCAATA	50			
296	MRPL24	順	TCCTAGAAGGCAAGGATGCC	51	60°C	×(0.92)	
		逆	GTGGGTTTCCTGTCCATAGG	52			
297	DSIP1	順	AACAGGCCATGGATCTGGTG	53	65°C	○(1.85)	
		逆	AGGACTGGAACCTTCTCCAGC	54			
279	QPRT	順	AGGATAACCATGTGGTGCC	55	60°C	× × (0.413)	○ (p=0.0092)
		逆	TGCAGCTCCTCTGGCTTGAA	56			
298	VNN1	順	GCTGGAACCTTCAACAGGGAC	57	60°C	×(1.11)	
		逆	CTGAGGATCACTGGTATCGC	58			
299	IRS2	順	TGAAGCTCAACTGCGAGCAG	59	60°C	○(1.57)	
		逆	ACGATTGGCTCTTACTGCGC	60			
300	FMO5	順	ACACAGAGCTCTGAGTCAGC	61	60°C	×(1.13)	
		逆	TCCAGGTTAGGAGGGAAGAC	62			
301	DCN	順	CCTCAAGGTCTTCTCCTTC	63	60°C	×(0.74)	
		逆	CACCAGGTACTCTGGTAAGC	64			

QPRT遺伝子は、逆相関を示す遺伝子であった。

その結果、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は、7 個であったが、有意に再発までの期間との相関を示した遺伝子はなかった。しかし、QPRT 遺伝子は、有意に逆の相関を示した。従ってこの遺伝子を、再発遅延群において、非癌部において発現亢進する遺伝子と同定した。

同様に、表 1 2 B は、表 1 0 B に示す症例を対象に、内部標準遺伝子に GAPDH または 18S rRNA を用いて表 1 2 B に示す条件で定量 PCR を行った解析結果を示す。

表 12B 「C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順/逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致 GAPDH校正	マイクロアレイと一致 18S rRNA校正	相関 (GAPDH)	相関 (18S rRNA)	2群間有意差 (GAPDH)	2群間有意差 (18S rRNA)
1	ALB	順	CAAAAGCATGGGCACTAGGTC	65	60°C	×	×				
		逆	CAAGCAGATCTCCATGGGAG	66							
2	NR0B2	順	TCTTCAACCCCGATGTGCCA	67	65°C	×	×				0.0220
		逆	AGGCTGGTCGGAATGGACTT	68							
3	AKR1B10	順	CTTGGAAGTCTCCTCTTGGG	69	60°C	×	×				
		逆	ATGAACAGGTCCTCCGCGTT	70							
4	MAFB	順	GACGTGAAGAAGGAGCCACT	71	60°C	×	×	r=0.422 (p=0.0171)	r=0.501 (p=0.0036)		0.0281
		逆	CGCCATCCAGTACAGATCCCT	72							
5	BF530535	順	TGCCATAGTGGGTTGATTTG	73	60°C	×	×				0.0486
		逆	TGAGAATCCGCGATCATGACA	74							
6	MRPL24	順	CAGGGGAAAGTGGTTCAAGT	75	65°C	×	×	r=0.431 (p=0.0147)	r=0.483 (p=0.0053)	0.0083	0.0083
		逆	TCTGAGTGGGTTCTCTGCG	76						0.0040	0.0426
7	DSIP1	順	AACAGGCGATGGATCTGCTG	77	65°C	○	○				
		逆	AGGACTGGAACCTTCTCCAGC	78							
8	QPRT	順	AACATCGCAGCGCTTGCTCAG	79	65°C	×	×				0.0075
		逆	TGGCAGTTGAGTTGGGTAAA	80							0.0231
9	VNN1	順	GCTGGAACTCAACAGGGAC	81	65°C	×	×			0.0018	0.0009
		逆	CTGAGGATCACTGGTATCGG	82						0.0035	0.0074
10	IRS2	順	CCACTCGGACAGGTTCTTCT	83	65°C	×	×	r=0.419 (p=0.0181)	r=0.462 (p=0.0082)		
		逆	GGATGCTCTCGTGGAATGTTG	84							
11	FMO5	順	ACACAGAGCTCTGAGTCAAG	85	60°C	×	×				
		逆	TCCAGGTTAGGAGGGAGAGC	86							
12	DCN	順	CCTCAAGGCTCTGCTCCTTC	87	60°C	×	×				
		逆	CACCAAGTACTGCTGGTAAGC	88							

マイクロアレイと一致とは、マイクロアレイ解析に用いた6例の定量PCRの結果から、再発遅延群/早期群の比を求め、1.5以上であったものを○とした。

×は差がなかったもの、××は逆相関したものを示す。

相関とは、再発月数が確定している31症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で相関を示したもののについて、r値(逆相関)とp値を記載した。

2群間の有意差とは、24ヶ月以内再発19症例と40ヶ月以上もしくは58ヶ月以上再発のない6症例(上段)もしくは4症例(下段)との間で、

有意に発現量の違い(逆相関)のあったもののについて、p値(Mann-Whitney U test)を示した。

その結果、発現亢進する遺伝子候補 1 2 個のうち、内部標準遺伝子に GAPDH 又は 18S rRNA を用いたときには、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は 1 個であった。しかし、内部標準遺伝子に GAPDH を用いたときには、MAFB 遺伝子、MRPL24 遺伝子、VNN1 遺伝子、IRS2 遺伝子は、有意に逆の相関を示した。また、内部標準遺伝子に 18S rRNA を用いたときには NR0B2 遺伝子、MAFB 遺伝子、BF530535 遺伝子、MRPL24 遺伝子、QPRT 遺伝子、VNN1 遺伝子、IRS2 遺伝子は、有意に逆の相関を示した。従って、これらの遺伝子を、再発遅延群において、非癌部において発現亢進する遺伝子と同定した。

以上のように種々の条件で検討することにより、C型肝細胞癌症例において再発を予測する非癌部発現遺伝子として、PSMB8 遺伝子、RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、RPS14 遺伝子、CXCL9 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、CYP1B1 遺伝子、TNFSF10 遺伝子、NR0B2 遺伝子、MAFB 遺伝子、BF530535 遺伝子、MRPL24 5 遺伝子、QPRT 遺伝子、VNN1 遺伝子及び IRS2 遺伝子という 15 個の遺伝子が同定された。上記遺伝子名の内容を以下に示す。

PSMB8 遺伝子 (LMP7 遺伝子ともいう) : proteasome subunit, beta type, 8 の遺伝子

RALGDS 遺伝子 : ral guanine nucleotide dissociation stimulator の遺伝子

10 GBP1 遺伝子 : guanylate-binding protein 1 の遺伝子

RPS14 遺伝子 : ribosomal protein S14 の遺伝子

CXCL9 遺伝子 : chemokine (C-X-C motif) ligand 9 の遺伝子

DKFZp564F212 遺伝子 : ドイツゲノムプロジェクトで見いだされた発現遺伝子で、遺伝子産物が同定されておらず、機能予測もできていない遺伝子

15 CYP1B1 遺伝子 : cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 の遺伝子

TNFSF10 : TNF (ligand) super family, member 10 の略で、TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)の遺伝子

NR0B2 遺伝子 : nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 の遺伝子

20 MAFB 遺伝子 : v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B の遺伝子

BF530535 遺伝子 : 遺伝子産物が同定されておらず、機能予測もできていない遺伝子

MRPL24 遺伝子 : mitochondrial ribosomal protein L24 の遺伝子

25 QPRT 遺伝子 : quinolinate phosphoribosyltransferase の遺伝子

VNN1 遺伝子 : vanin 1 の遺伝子

IRS2 遺伝子 : insulin receptor substrate 2 の遺伝子

実施例 3

B 型肝炎細胞癌症例における各群の遺伝子の再発期間と発現量の相関の検討

以下のとおり、B 型肝炎細胞癌症例のうち、再発遅延群と再発早期群各々の非癌部において発現亢進する遺伝子について、再発までの期間と発現量との相関を検討した。

遺伝子発現プロファイル解析に用いた B 型肝炎細胞癌症例 4 例を含め、計 16 例の非癌部のサンプルを対象とした。各症例の臨床病理学的知見と再発までの期間（再発なしの期間）を表 13 に示す。

表13 B型肝炎細胞癌症例

症例番号	性別	年齢	非癌部	stage	再発なしの月数	マイクロアレイ
67	M	45	CH	II	>99	遅延群
87	M	45	CH	I	>92	
85	F	64	NL	II	84	
93	M	58	CH	I	>67	
94	F	59	LC	I	>66	
60	M	60	NL	I	64	遅延群
35	M	69	CH	I	>48	
45	M	68	CH	I	>48	
84	M	51	CH	I/II	47	
54(86)	M	52	CH	II	27	
47	M	36	CH	I	23	早期群
8	M	68	CH	II	17	
13	F	51	CH	I	14	
42(88)	M	74	CH	II	14	
89	M	45	CH	II	9	
9	M	44	CH	II	7	早期群

CH: 慢性肝炎、LC: 肝硬変、NL: 正常肝。

stage I/IIは、どちらかではあるが不明。

再発なしの月数とは、再発までの月数の他、調査時点で未だ再発がみられないものも含む。

表 1 における再発遅延群の非癌部において発現亢進する遺伝子 (BNgood) の 24 個、及び表 5 における再発早期群の非癌部において発現亢進する遺伝子 (BNbad) の 47 個の、合計 71 個の遺伝子に関して、再発期間と発現量との関係を検討した。

まず、各症例非癌部肝組織から、上記実施例 1 と同様の方法で total RNA を抽出した。

total RNA 中に混在する DNA の影響を除去するため、DNase I (DNase I (TAKARA SHUZO, Kyoto, Japan)で 37℃、20 分処理した後、TRIzol reagent で再精製した。10 μ g の total RNA を用いて 25 unit の AMV reverse transcriptase XL(TAKARA)と 250 pmol の 9-mer ランダムプライマーを含む 100 μ l の反応液に
5 より逆転写反応を行った。

リアルタイム PCR には、合成 cDNA を各々 0.25-50 ng 相当ずつ用いて行った。SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) の 25 μ l の反応溶液を用いて ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)により、予備加熱を 95℃、10 分行ったのち、95℃15 秒に続けて 60℃(または 65℃)、60 秒を 40-45 サイクル
10 という条件で PCR を行った。

各サンプルの内部標準遺伝子として、GAPDH 又は 18S rRNA を用いて絶対的定量解析を行った。標準試料の系列希釈を行って同時に測定したものを検量線作成に用いた。

標的遺伝子および内部標準遺伝子の絶対発現量を求め、サンプルごとに標的遺伝子発現量／内部標準遺伝子発現量の比を算出して評価に用いた。測定はすべて
15 duplicate で行った。

表 1 4 および表 1 5 中の「マイクロアレイと一致」とは、実施例 2 の記載と同様に、マイクロアレイ解析に用いた 4 例 (表 1 3 の症例番号 67、60、13、9) の定量 PCR の結果から、再発遅延群 (症例番号 67、60) と早期群 (症例番号 13、
20 9) との比を求め、1.5 以上であったものが、実施例 1 のマイクロアレイの結果と一致することを意味する。上記比が 1.5 以上、好ましくは 2 以上のものを○とした。「○」に隣接するカッコ内の数字は比の値を示す。「マイクロアレイと一致」の欄の「×」はマイクロアレイの結果と不一致なものを示す。「××」は、マイクロアレイの結果とは逆相関したものを示す。

25 表 1 4 および表 1 5 中の「相関」の欄は、再発月数が確定している 10 症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で、相関を示したのものについて r 値及び p 値を記載した。

表 1 4 および表 1 5 中の「2 群間の有意差」の欄は、24 ヶ月以内再発 6 症例と

48ヶ月以上再発のない8症例(表14、表15中「2群間の有意差」欄上段)もしくは60ヶ月以上再発のない6症例((表14、表15中「2群間の有意差」欄下段)との間で、有意に発現量の違いのあったものについて、p値(Mann-Whitney U test)を示した。

- 5 試験に用いたプライマー配列(センス鎖(順)、アンチセンス鎖(逆))を表14および表15に示す(配列番号89~228)。

B型肝細胞癌症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子候補(BNgood)の24個を解析した結果を表14に示す。表14は、表13に示す症例を対象に、内部標準遺伝子にGAPDH又は18S rRNAを用いて表14に示す条件

10 で定量PCRを行った解析結果を示す。

表14 「B型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順/逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致(GAPDH補正)	マイクロアレイと一致(18S rRNA補正)	相関 (GAPDH)	相関 (18S rRNA)	2群間有意差 (GAPDH)	2群間有意差 (18S rRNA)
1	TNFSF14	順	CTGTTGGTCAGCCAGCAGT	89	65℃	O(8.11)	O(2.36)				
		逆	GAAAGGCCCGAAGTAAGACG	90							
2	MMP2	順	CAAGGACCGGTTTCATTGGG	91	60℃	O(3.82)	O(2.09)				0.0065
		逆	GAACACAGCCCTTCCTCCT	92							
3	SAA2	順	TGCTCGGGGGAACATGATG	93	60℃	O(5.20)	O(2.47)				
		逆	GGCCTGTGAAGTCTGTGATA	94							
4	COL1A1	順	GGAAGAGTGGAGAGTACTGG	95	60℃	O(2.56)	×(1.33)				
		逆	ATCCATCGGTGATGCTCTCG	96							
5	COL1A2	順	GTATTGCTGGCCCTGTTGGT	97	60℃	O(2.92)	O(1.52)				
		逆	CTCAGCCCTTGTACCGCTCT	98							
6	DPYSL3	順	CTTTGAAGGATGGAGCTGC	99	65℃	O(1.52)	×(0.78)				
		逆	ATCGTACATGCCCTTGGGA	100							
7	PPARD	順	GGCCTCTATGCTCAACAAAG	101	60℃	×(1.04)	××(0.40)				
		逆	GCCTTGAACCTTGACAGCAA	102							
8	LUM	順	TACCAATGGTGCCTCCTGGA	103	60℃	×(1.38)	×(0.82)				
		逆	CCACAGAGCTGTGTCAGGTTG	104							
9	MSTP032(RGS5)	順	CTGGAAGGGGCAAGGAGAT	105	60℃	O(1.79)	×(1.03)				
		逆	TCTGGGTCTTGGCTGGTTT	106							
10	CRP	順	TGGCCAGACAGACATGTCGA	107	60℃	O(3.43)	O(1.60)				
		逆	TGAGGACAGTCCCTGTAG	108							
11	TRIM38	順	TCTCTGGAAGGCTGGAGAAAG	109	55℃	×(1.18)	××(0.49)				
		逆	GTTTCCAGCTTGACAGCCCA	110							
12	S100A8	順	ATTGGCTCGAAGCTGCAGGA	111	60℃	O(1.83)	×(0.87)				
		逆	GGAAGGTGACATACTCCTGG	112							
13	PZP	順	TACTGCAATGCAACCAACAA	113	65℃	O(4.39)	O(2.15)		r=0.717 (p=0.0171)		
		逆	AACAGAAATTGGGATGCACA	114							
14	EMP1	順	TGGTGTGCTGGCTGTGCATT	115	60℃	O(1.85)	×(0.92)				
		逆	GACGAGATAGAGAACGCCGA	116							
15	AI590053 (AL137672)	順	GTGAATGCCCTCTGGAGTGGT	117	65℃	×(1.20)	××(0.46)				
		逆	TTCTGTCTGTGACGCCAAGTG	118							
16	MAP3K5	順	GTTCTAGCCAGTACTTCCGG	119	60℃	O(1.64)	×(0.69)			0.0528	
		逆	ACTCGCTCCGAATTCTTGC	120							
17	TIMP1	順	ATTCCGACCTCGTCATCAGG	121	60℃	O(2.91)	O(1.62)				
		逆	GCTGGTATAAGGTGCTGTGG	122							
18	GSTM1	順	GGACTTTCCCAATCTGCCCT	123	60℃	O(3.19)	O(1.64)				
		逆	AGGTTGTGCTTGCGGGCAAT	124							
19	CSDA	順	AGGAGAGAGGGTGCAGAAAG	125	60℃	O(2.50)	×(1.09)				
		逆	CCTTCGATAGTAGCCACGTG	126							
20	GSTM2	順	ACAAACCTGTGGGGGAAATCA	127	65℃	O(1.82)	×(0.75)				
		逆	GGTCATAGCAGAGTTTGGCC	128							
21	SGK	順	GCAGAAAGGACAGGACAAAGC	129	60℃	O(1.75)	×(0.71)				
		逆	CAGGCTCTTCGGTAAAGCTGG	130							
22	LMNA	順	ATGGAGATGATCCCTTGGTG	131	60℃	×(1.11)	××(0.50)				0.0282(逆) 0.0547(逆)
		逆	AGGTGTCTGTGCTCTCCAG	132							
23	MGP	順	GCTGTAAAGCTGTCCAGGAG	133	60℃	O(3.12)	O(1.83)				
		逆	CGCTTCTGAAAGTAGCGATT	134							
24	LTBP2	順	GCGACACAGAGGTGCAAGGA	135	60℃	O(2.20)	×(1.21)				
		逆	TGACCATGATGAGCCCTGA	136							

マイクロアレイと一致とは、マイクロアレイ解析に用いた4例の定量PCRの結果から、再発遅延群/早期群の比を求め、1.5以上であったものを○とした。

×は差がなかったもの、××は逆相関したものを示す。

相関とは、再発月数が確定している10症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で相関を示したもののについて、r値とp値を記載した。

2群間の有意差とは、24ヶ月以内再発6症例と48ヶ月以上もしくは60ヶ月以上再発のない8症例(上段)もしくは6症例(下段)との間で、有意に発現量の違いのあったものについて、p値(Mann-Whitney U test)を示した。

その結果、発現亢進する遺伝子候補 24 個のうち、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は、GAPDH を内部標準遺伝子に用いたときには 19 個であり、そのうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子はなかった。また、上記遺伝子のうち、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は 18srRNA を内部標準遺伝子に用いたときには 9 個であり、そのうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子は 1 個(PZP 遺伝子)であった。

再発遅延群と早期再発群の 2 群間有意差検定を行った結果、差のあった遺伝子は、標準遺伝子に GAPDH を用いたときは 1 個(MAP3K5 遺伝子)であり、18S rRNA を用いたときは 1 個(TNFSF14 遺伝子)であったが、反対に、再発までの期間と逆相関して有意に差のあった遺伝子が 1 個 (LMNA 遺伝子) あった。従ってこの遺伝子を、早期再発群において、非癌部において発現亢進する遺伝子と同定した。

次に、B 型肝細胞癌症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子候補(BNbad)の 47 個を解析した結果を表 1 5 に示す。表 1 5 は、表 1 3 に示す症例を対象に、内部標準遺伝子に GAPDH 又は 18S rRNA を用いて表 1 5 に示す条件で定量 PCR を行った解析結果を示す。

表15 「B型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順ノ逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング 温度	マイクロアレイ 値(GAPDH補正)	マイクロアレイ 値(18S rRNA補正)	相関 (GAPDH)	相関(18 S rRNA)	2群間有意 差 (GAPDH)	2群間有意差 (18S rRNA)
1	GTH	順	TGAATGGCCACAGTGAATGTT	137	60°C	O(4.47)	O(13.25)				
		逆	CGATTCCGTTTTTGAAATGC	138							
2	OAT	順	TGGTAAGTGGGGCTATACCG	139	60°C	O(2.70)	O(11.89)				
		逆	CTGGTTGGGTCTGTGGAACT	140							
3	PRODH	順	CTGACCACCGGGTGTACTTT	141	60°C	O(4.61)	O(22.30)				
		逆	GACAAGTACGGGAGCACCTC	142							
4	CYP3A7	順	GGAACCCGTACACATGGACT	143	60°C	× × (0.39)	× (1.27)				
		逆	AACGTGGAATAGCCCTTACG	144							
5	DDT	順	CGCCGAGTTCTTTGAGTTTC	145	60°C	× (1.04)	O(4.42)				
		逆	CATGACCGTCCCTATCTTGC	146							
6	PGRMC1	順	TATGGGGTCTTTGTGGAAAG	147	65°C	× (1.15)	O(3.48)				
		逆	GCCACGCTGATGATCTTGA	148							
7	AKR1C1	順	GGTCACTTGTGCGCTGTCT	149	60°C	× (1.32)	O(3.95)				
		逆	TATGGCGGAAGCGAGGTTCA	150							
8	HGD	順	CACAAGCCCTTTGAATCCAT	151	60°C	O(1.61)	O(5.80)				
		逆	TGTCTCGAGCTCCACACAAAG	152							
9	FHR4	順	TTGAGAAATTCAGAGCCAAAG	153	60°C	× (0.83)	O(1.85)				
		逆	CACCCATCTTCCACACACAC	154							
10	FST	順	AAGACCGAACTGAGCAAGGA	155	65°C	O(3.58)	O(6.80)				
		逆	TTTTTCCAGGTCACACAGTC	156							
11	COX4	順	-	-	-	-	-				
		逆	-	-	-	-	-				
12	APP	順	CGGGCAAGACTTTTCTTTGA	157	60°C	× (1.28)	O(4.13)				
		逆	TGCCTTCTGATCCCTTAT	158							
13	PSPHL	順	TCCAAGGATGATCTCCCACT	159	60°C	O(4.97)	O(5.44)				
		逆	AGCATCCGATTCCTTCTTCA	160							
14	CYP1A1	順	TGATAAGCACGTTGCAGGAG	161	85°C	O(2.77)	O(11.30)				0.0389
		逆	AAGTCAGCTGGTTTCCAGA	162							0.0547
15	ZNF216	順	GGTGTGAGAGCCAGTTGTCA	163	60°C	O(1.84)	O(5.39)				
		逆	AAATTTCCAGATCGGCAGTC	164							
16	LEPR	順	CCACCATTTGATGATTTCC	165	60°C	O(5.78)	O(14.99)				
		逆	CCGCTCACCTGAACCTCATA	166							
17	TOM1L1	順	TTTTGTGGAACATTCAAATTCA	167	60°C	× (0.89)	O(2.61)				
		逆	CAGTTTTTGTGATCGCTGGA	168							
18	PECR	順	TGCAGTGGAAATACGGATCAA	169	60°C	× (1.18)	O(3.49)				
		逆	GGAAGCAGACACAGAGGAG	170							
19	ALDH7A1	順	AGTGGAGGGTGTGGGTGAAG	171	65°C	× (1.34)	O(3.45)				
		逆	CAACCATACACTGCCACAGG	172							
20	GNMT	順	CAGTTAAGGAGCGGTGGAAC	173	60°C	O(1.82)	O(6.15)				
		逆	TTTGAGTCTGGCAAGTGAG	174							
21	OATPC	順	GCCAGTTCTGTTCTGTGTTT	175	60°C	× (1.27)	O(3.50)				
		逆	TGCACCATAAAGATGTGGAAA	176							
22	AKR1B10	順	CTCCAGCTCATGTCCCATTT	177	60°C	O(2.92)	O(8.05)				
		逆	TCAAGCCATGCTTTTCTGTG	178							
23	ANGPTL3	順	ATTTTAGCCAAATGGCGTCT	179	60°C	× (1.18)	O(3.37)				
		逆	CAGTGGTTTGACGCGATAGA	180							
24	AASS	順	ATTGGTGAATTTGGATTGGA	181	60°C	O(2.04)	O(6.83)				
		逆	GAAGCCACACAGTAGGAA	182							
25	CALR	順	TGGATCGAATGCCAAACAGAA	183	60°C	× (1.12)	O(2.77)				
		逆	GTGGCTGTCTGCAAACTTT	184							
26	BAAT	順	CTCCATCATCCACCCAGTTT	185	60°C	× (1.15)	O(4.06)				
		逆	GGAAGGCCAGCAAGTGATGA	186							
27	PMM1	順	GCCAGAAAATTGACCCTGAG	187	60°C	× (1.04)	O(3.53)				
		逆	CAGCTGCTCAGCGATTTAC	188							
28	RABR	順	CCCTCATCTGTCAAGTGAA	189	60°C	× (1.15)	O(3.78)				
		逆	AGCATCAACAGAGCCAAACC	190							
29	GLUL	順	TTGTTTGGGTGGGATAGAGG	191	60°C	× (0.85)	O(2.41)				
		逆	GCTGTGTCGGATAGGTACG	192							
30	CSHMT	順	CCCTACAAAGGTGAACCCAGA	193	60°C	× (1.20)	O(3.33)				
		逆	GGAGTAGCAGGTGTTCTCTG	194							

(表15続き)

番号	遺伝子	順/逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング 温度	マイクロアレイ一 致(GAPDH補正)	マイクロアレイ一 致(18S-rRNA補正)	相関 (GAPDH)	相関(18S rRNA)	2群間有意 差 (GAPDH)	2群間有意差 (18S rRNA)
31	UGT1A3	順 逆	TGACAACTATGCCATTTCCG CCACACAGAGCCTATGATAGA	195 196	60℃	× (0.89)	○ (3.10)				
32	HSPG1	順 逆	CTCAAGGATGACGTGGGTTT GATTTCTCTGGCCAATTCA	197 198	60℃	× (1.45)	○ (4.17)				
33	QPRT	順 逆	AACACGCGAGCCTTGGTCAG TGGCAGTTGAGTTGGGTAAA	199 200	60℃	× (1.24)	○ (3.91)				
34	DEPP	順 逆	GATGTTACCAATCCCGTTCCG TGGGCTCCTATATGCGGTTA	201 202	60℃	○ (2.68)	○ (8.92)				
35	CA2	順 逆	TGCTTTCAACGTGGAGTTTG CCCCATATTTGGGTGTTCCAG	203 204	65℃	○ (1.73)	○ (4.89)				
36	FTHFD	順 逆	CAAAATGCTGCTGGTGAAGA GCCTGTGTCAGCTCAAGGAC	205 206	60℃	× (1.28)	○ (4.65)				
37	LAMP1	順 逆	GTCTGTCAGCAGCCATGTTTA GGCAGGTCAAAGGTCTATGTT	207 208	60℃	× × (0.61)	○ (1.97)				
38	FKBP1A	順 逆	GGGATGCTTGAAGATGGAAA CAGTGGCACCATAGGCATAA	209 210	60℃	× (0.79)	○ (1.79)				
39	BNIP3	順 逆	GCTCTGGGTAGAACTGCAC GCCTGTTTGGTATCTTTGTGG	211 212	60℃	× (1.00)	○ (2.70)				
40	MAP3K12	順 逆	TTGAGGAAATCTGTGGACCTG TTGAGGTCTGGCACTTCTTT	213 214	60℃	× × (0.59)	○ (1.52)				
41	ASS	順 逆	GTGATGGAAGTACGCAAGCA CTCGAGAAATGTCAAGGGTGT	215 216	60℃	○ (2.81)	○ (9.16)				
42	ACTB	順 逆	ACAGAGCCTGGCCTTTGG CACGATGGAGGGGAAGAC	217 218	60℃	× (0.74)	○ (2.04)				
43	PLAB	順 逆	GAGCTGGGAAGATTGGAACA AGAGATACGACAGGTGCAGGT	219 220	60℃	○ (2.57)	○ (5.03)				
44	ENO1L1	順 逆	GAGATCTGCCCGGCTTTAC CCGAGAGCTCAAGATCTGC	221 222	60℃	× (0.75)	○ (2.14)				
45	IGFBP3	順 逆	CAGCTCCAGGAAATGCTAGTG GGTGGAACTTGGGATCAGAG	223 224	60℃	× (0.88)	○ (2.81)			0.0528(逆)	
46	UK114	順 逆	GAGGGAAGGCTTAGCCATGT TTGAAGGGTCCATGCCTATC	225 226	60℃	× (1.11)	○ (3.13)				
47	ERF1	順 逆	GCCTGTAAAGTACGGGGACAA GTCTTGARGGTTGTGATGTA	227 228	60℃	× (1.16)	○ (2.82)				

遺伝子番号22と33はGNbedと共通する遺伝子であるが、22のPCRプライマーは異なる配列を用いた。
 遺伝子番号11は2 primer setを用いてPCRを試みたが、いずれにおいても安定した増幅が得られなかったため保留とした。
 マイクロアレイと一致とは、マイクロアレイ解析に用いた4例の定量PCRの結果から、再発早期群/遅延群の比を求め、1.5以上であったものを○とした。
 ×は差がなかったもの、××は逆相関したものを示す。
 再発月数が設定している10症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で相関を示したものはなかった。
 2群間の有意差とは、24ヶ月以内再発症例と48ヶ月以上もしくは80ヶ月以上再発のない症例(上段)もしくは6症例(下段)との間で、
 有意に発現量の違いのあったものについて、p値(Mann-Whitney U test)を示した。

その結果、GAPDH を内部標準遺伝子に用いたときには、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は 16 個であったが、有意に再発までの期間との相関を示した遺伝子はなかった。しかし、IGFBP3 遺伝子は、2 群間有意差検定において有意に逆の相関を示した。従ってこの遺伝子を、再発遅延群において、非癌部において発現亢進する遺伝子と同定した。

また、18S rRNA を内部標準遺伝子に用いたときには、マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は 45 個であったが、有意に再発までの期間との相関を示した遺伝子はなかった。しかし、CYP1A1 遺伝子は、2 群間有意差検定において有意に相関を示した。従ってこの遺伝子を、再発早期群において、非癌部において発現亢進する遺伝子と同定した。

以上より、B 型肝細胞癌症例において再発を予測する非癌部発現遺伝子として、PZP 遺伝子、MAP3K5 遺伝子、TNFSF14 遺伝子、LMNA 遺伝子、CYP1A1 遺伝子及び IGFBP3 遺伝子という 6 つの遺伝子が同定された。上記遺伝子の内容を以

下に示す。

PZP 遺伝子：pregnancy-zone protein の遺伝子

MAP3K5 遺伝子：mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 の遺伝子

TNFSF14 遺伝子：tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14 の遺伝子

5 子

LMNA 遺伝子：lamin A/C の遺伝子

CYP1A1 遺伝子：cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 の遺伝子

子

IGFBP3 遺伝子：insulin-like growth factor binding protein 3 の遺伝子

10

実施例 4

再発早期群と再発遅延群とを判別するための遺伝子の組合わせの選択

実施例 2 及び 3 の結果より得られた、C 型又は B 型肝細胞癌の再発を予測する非癌部発現遺伝子を複数組み合わせることにより、より正確な再発予測を行うことが可能となる。このような遺伝子のセットは、多種考えられる。前記組合わせの 1 例を表 16 に示す。

15

表16 肝細胞癌再発早期群と遅延群とを判別する遺伝子の組み合わせの例

原因別	早期群	遅延群	GAPDH補正	18S rRNA補正
C型肝細胞癌	<24ヶ月	>40ヶ月	VNN1 MRPL24	VNN1 CXCL9 GBP1 RALGDS
	分類率		88%	100%
B型肝細胞癌	<24ヶ月	>48ヶ月	PRODH LMNA MAP3K12	LMNA LTBP2 COL1A2 PZP
	分類率		100%	100%

(1) C 型肝細胞癌の予測

再発 24 ヶ月までの早期再発群と、40 ヶ月以上再発のない再発遅延群とを判別するのに、内部標準遺伝子に GAPDH を用いて補正する場合は VNN1 及び MRPL24 の各遺伝子発現量を調べればよい。あるいは、上記判別を内部標準遺伝子に 18S rRNA を用いて補正する場合は、VNN1、CXCL9、GBP1 及び RALGDS の遺伝子セットについての各遺伝子の発現量を調べればよい。上記各遺伝子の発現量を、各遺伝子で求められていた判別関数係数を用いた判別式に代入し、その値を判別に用いる。当該遺伝子群の発現レベルを解析することによる、早期再発群と再発遅延群との分類率は、GAPDH 補正の場合は 88%であり、18S rRNA の場合は 100%である。

(2) B 型肝細胞癌の予測

再発 24 ヶ月までの早期再発群と、48 ヶ月以上再発のない再発遅延群とを判別するのに、内部標準遺伝子に GAPDH を用いて補正する場合は PRODH、LMNA 及び MAP3K12 の遺伝子セットについての各遺伝子発現量を調べればよい。あるいは、上記判別を内部標準遺伝子に 18S rRNA を用いて補正する場合は、LMNA、LTBP2、COL1A2 及び PZP の遺伝子セットについての各遺伝子発現量を調べればよい。上記と同様、これらの発現量を判別式に代入し、その値を判別に用いる。当該遺伝子群の発現レベルを解析することによる早期再発群と再発遅延群との分類率は、GAPDH 補正の場合も 18S rRNA の場合も 100%である。

上記遺伝子の内容を以下に示す。

PRODH 遺伝子：proline dehydrogenase (oxidase) 1 の遺伝子

LTBP2 遺伝子：latent transforming growth factor beta binding protein 2 の遺伝子

COL1A2 遺伝子：collagen, type I, alpha 1 の遺伝子

MAP3K12 遺伝子：mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12 の遺伝子

産業上の利用可能性

患者及び健常人由来の共通遺伝子と原因別特異遺伝子とを同定することで、予

後の予測、再発の予測が可能になるため、診断、治療法開発、治療薬選択の戦略（テーラーメイド医療）に役立てることができる。

配列表フリーテキスト

5 配列番号 1 ～ 2 2 8 : 合成 DNA

請求の範囲

1. 癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体から total RNA を採取し、

5 (b) 表 1 ～ 8 に示される遺伝子から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価することを含む前記方法。

2. 癌の評価方法であって、以下のステップ：

10 (a) 検体から total RNA を採取し、

(b) PSMB8 遺伝子、RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、RPS14 遺伝子、CXCL9 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、CYP1B1 遺伝子、TNFSF10 遺伝子、NR0B2 遺伝子、MAFB 遺伝子、BF530535 遺伝子、MRPL24 遺伝子、QPRT 遺伝子、VNN1 遺伝子及び IRS2 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定し、

15 (c) 前記測定結果を指標として癌を評価することを含む前記方法。

3. 癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体から total RNA を採取し、

20 (b) PZP 遺伝子、MAP3K5 遺伝子、TNFSF14 遺伝子、LMNA 遺伝子、CYP1A1 遺伝子及び IGFBP3 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価することを含む前記方法。

25 4. 癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体から total RNA を採取し、

(b) VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、又は PRODH 遺伝子、LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セットに含まれ

る各遺伝子の発現量を、内部標準遺伝子として GAPDH を用いて測定し、

- (c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること
を含む前記方法。

5. 癌の評価方法であって、以下のステップ：

5 (a) 検体から total RNA を採取し、

(b) VNN1 遺伝子、CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、又は LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子からなる遺伝子セットに含まれる各遺伝子の発現量を、内部標準遺伝子として 18S rRNA を用いて測定し、

10 (c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること
を含む前記方法。

6. 癌の評価が、転移の有無又は再発の有無の予測である請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

7. 癌が肝細胞癌である請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

15 8. 遺伝子の発現量の測定が、配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1～114 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組用いて遺伝子を増幅することにより行なわれるものである請求項 2 又は 3 記載の方法。

20 9. 遺伝子の発現量の測定が、VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、PRODH 遺伝子、LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セット、VNN1 遺伝子、CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、並びに LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子からなる遺伝子セットからなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子セットに含まれる各遺伝子を増幅するためのプライマーの組合せを用いて、遺伝子を増幅することにより行われるものである請求項 4 又は 5 記載の方法。

25 10. 配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1～114 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組含むプライマーセット。

1 1. VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、PRODH 遺伝子、
LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セット、VNN1 遺伝子、
CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、
並びに LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子から
5 なる遺伝子セットからなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子セッ
トに含まれる各遺伝子を増幅するためのプライマーの組合せを含むプライ
マーセット。

1 2. 表 1~8 に示されるいずれかの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

1 3. RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、TNFSF10 遺伝
10 子及び QPRT 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子を含む、
癌の評価用キット。

1 4. VNN1 遺伝子及び MRPL24 遺伝子からなる遺伝子セット、PRODH 遺伝子、
LMNA 遺伝子及び MAP3K12 遺伝子からなる遺伝子セット、VNN1 遺伝子、
CXCL9 遺伝子、GBP1 遺伝子及び RALGDS 遺伝子からなる遺伝子セット、
並びに LMNA 遺伝子、LTBP2 遺伝子、COL1A2 遺伝子及び PZP 遺伝子から
15 なる遺伝子セットからなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子セッ
トに含まれる各遺伝子を含む、癌の評価用キット。

1 5. さらに請求項 1 0 又は 1 1 記載のプライマーセットを含む、請求項 1 2 ~
1 4 のいずれか 1 項記載のキット。

図1



SEQUENCE LISTING

<110> Nihon University

<120> A gene which relates to a hepatoma

<130> P03-0134PCT

<150> JP 2003-299363

<151> 2003-08-22

<150> JP 2003-334444

<151> 2003-09-25

<160> 228

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

agactgtcag tactgggagc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

gtccaggacc ctcttatcc

20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 3
gacgtgggaa gacgtttcca 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4
tggatgatgc ccgtctcctt 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 5
aatigcccag ggatgaggca 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 6

tggactcctg gatcttcctc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 7

gagaactcag ctgcagtgca

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 8

ttctagctgg gccgctaact

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 9

gacgtgcaga aatggcacct

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 10

cagtcacacg gcagatggtt

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 11

cctgcatcag caccaaccaa

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

tggctgacct gttctccca

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 13

ccacatccac cactagacac

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

tgacagatgt cctctgaggc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 15

cctcttcacc aggtatcctg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 16

ccacagtgtc cttgggaatg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 17

gctgaagcag atgcaggaca

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 18

ctaacgagct gacggagttg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 19

ggaggttcga agacgatcag

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 20

gtggcgccct tccgtcaatt

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 21

agactgtcag tactgggagc

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 22

gtccaggacc ctcttatcc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 23

gtgtggccaa ctgtgtcatc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 24

cttcagacgg tggatggagt

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 25

aatigcccag ggatgaggca

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 26

tggactcctg gatcttcctc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 27

aacaagctgg ctggaagaa

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 28

gtacacgaag gtgctgctca

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 29

gacgtgcaga aatggcacct

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 30

cagtcacacg gcagatggtt

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 31

cctgcatcag caccaaccaa

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 32

tggtgacct gtttctccca

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 33
tgggcaagtg aggtcttctt

20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 34
ctgaggatca ctggtatcgc

20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 35
gacccccagt ctcaatctca

20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 36
agtctcttgg cgtcgtcagt

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 37

gctgaagcag atgcaggaca

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 38

ctaacgagct gacggagttg

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 39

ggtcggagtc aacggatttg

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 40

ggatctcgct cctggaagat

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 41

caaagcatgg gcagtagctc

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 42

caagcagatc tccatggcag

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 43

tcttcaaccc cgatgtgccca

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 44

aggctggtcg gaatggactt

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 45

cttgggaagtc tcctcttggc

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 46

atgaacaggt cctcccgctt

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 47

accatcatca ccaagcgtcg

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 48

tcacctgctc ctgggtgaag

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 49

gtgcctcac catctgtaca

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 50

ctggaggaca gctgccaata

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 51

tcctagaagg caaggatgcc

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 52

gtgggtttcc tglccatagg

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 53

aacaggccat ggatctggtg

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 54

aggactggaa cttctccagc

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 55

aggataacca tgtgtggcc

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 56

tgcagctcct ctggcttgaa

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 57

gctggaactt caacagggac

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 58

ctgaggatca ctggtatcgc

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 59

tgaagctcaa ctgcgagcag

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 60

acgattggct cttactgcgc

20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 61
acacagagct ctgagtcagc

20

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 62
tccaggttag gaggaagac

20

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 63
cctcaaggtc ttctctcttc

20

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 64

caccaggtac tctggttaagc

20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 65

caaagcatgg gcagtagctc

20

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 66

caagcagatc tccatggcag

20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 67

tcttcaaccc cgatgtgcca

20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 68

aggctggtcg gaatggactt

20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 69

cttggaagtc tcctcttggc

20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 70

atgaacaggt cctcccgctt

20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 71

gacgtgaaga aggagccact

20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 72

cgccatccag tacagatcct

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 73

tgccatagtg gcttgatttg

20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 74

tcagaatccc catcatcaca

20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 75

cagggcaaag tggttcaagt

20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 76

tctcagtggg tttcctgtcc

20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 77

aacaggccat ggaatctggtg

20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 78

aggactggaa cttctccagc

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 79

aactacgcag ccttggtcag

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 80

tggcagttga gttgggtaaa

20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 81

gctggaactt caacagggac

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 82

ctgaggatca ctggtatcgc

20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 83

ccactcggac agcttcttct

20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 84

ggatggtctc gtggatgttc

20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 85

acacagagct ctgagtcagc

20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 86

tccaggttag gaggaagac

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 87

cctcaaggtc ttctccttc

20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 88

caccaggtac tctggtaagc

20

<210> 89

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 89

ctgttggtca gccagcagt

19

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 90

gaaagccccc aagtaagacc

20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 91

caaggaccgg ttcatttggc

20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 92

gaacacagcc ttctctcct

20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 93

tgctcggggg aactatgatg

20

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 94

ggcctgtgag tctctggata

20

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 95

ggaagagtgg agagtactgg

20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 96

atccatcggt catgctctcg

20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 97

gtattcctgg ccctgttggt

20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 98

ctcacccttg ttaccgctct

20

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 99

ctttgaaggg atggagctgc

20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 100

atcgtaatg ccccttgga

20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 101

ggcctctatc gtcaacaagg

20

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 102

gcgttgaact tgacagcaaa

20

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 103

taccaatggt gcctcctgga

20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 104

ccacagactc tgtcaggttg

20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 105

ctggaaaggg ccaaggagat

20

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 106

tctgggtcctt ggctggtttc

20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 107

tggccagaca gacatgtcga

20

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 108

tcgaggacag ttccgtgtag

20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 109

tctctggagg ctggagaaag

20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 110

gtttccagct tcacagccca

20

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 111

attggctcga agctgcagga

20

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 112

ggaaggtgac atactcctgg

20

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 113

tactccaatg caaccaccaa

20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 114

aacacaagtt gggatgcaca

20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 115

tgggtgctg gctgtgcatt

20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 116

gaccagatag agaacgccga

20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 117

gtgaatgcct ctggagtgt

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 118

ttctgttctg acgccaagt

20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 119

gttctagcca gtacttccgg

20

<210> 120

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 120

actcgctccg aattcttgc

19

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 121

attccgacct cgtcatcagg

20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 122

gctgggtataa ggtgggtctgg

20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 123

ggacttttccc aatctgccct

20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 124

aggttgtgtgt tgcgggcaat

20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 125

aggagagaag ggtgcagaag

20

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 126

ccttccatag tagccacgtc

20

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 127

acaacctgtg cggggaatca

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 128

ggtcatagca gagtttggcc

20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 129

gcagaaggac aggacaaagc

20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 130

caggctcttc ggtaaactcg

20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 131

atggagatga tcccttgctg

20

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 132

aggtgttctg tgccttcac

20

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 133

gctctaagcc tgtccacgag

20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 134

cgcttcctga agtagcgatt

20

<210> 135

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 135

gcgacacagg agtgtcaaga

20

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 136

tgaccatgat gtagccctga

20

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 137

tgaatggcca cagtgatgtt

20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 138

ccattccggtt ttgaaatgc

20

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 139

tcgtaagtgg ggctataccg

20

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 140

ctggttgggt ctgtggaact

20

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 141

ctgaccaccg gggtacttt

20

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 142

gacaagtagg gcagcacctc

20

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 143

ggaacccgta cacatggact

20

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 144

aacgtccaat agcccttacg

20

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 145

cgcccacttc tttagatttc

20

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 146

catgaccgtc cctatcttgc

20

<210> 147

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 147

tatggggtct ttgctggaag

20

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 148

gcccacgtga tgatacttga

20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 149

ggtcacitca tgcctgtcct

20

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 150

tatggcggaa gccagcttca

20

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 151

cacaagccct ttgaatccat

20

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 152

tgtctccagc tccacacaag

20

<210> 153

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 153

ttgagaattc cagagccaag a

21

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 154

cacccatctt caccacacac

20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 155

aagaccgaac tgagcaagga

20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 156

tttttcccag gtccacagtc

20

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 157

cgggcaagac ttttctttga

20

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 158

tgccttcctc atcccccttat

20

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 159

tccaaggatg atctcccact

20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 160

agcatccgat tccttcttca

20

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 161

tgataagcac gttgcaggag

20

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 162

aagtcagctg ggtttccaga

20

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 163

gggtgcagag ccagttgtca

20

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 164

aaatttcac atcggcagtc

20

<210> 165

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 165

ccaccattgg taccatttcc

20

<210> 166

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 166

cccctcacct gaacctcata

20

<210> 167

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 167

ttttctggaa cattcaaatt ca

22

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 168

cactttttgt catcgctgga

20

<210> 169

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 169

tgcagtggaa tacggatcaa

20

<210> 170

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 170

ggaagcagac cacagaggag

20

<210> 171

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 171

agtggaaggt gtgggtgaag

20

<210> 172

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 172

caaccataca ctgccacagg

20

<210> 173

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 173

cacttaagga gcgctggaac

20

<210> 174

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 174

tttgcagtct ggcaagtgag

20

<210> 175

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 175

gccacttcg ctctgtgtt t

21

<210> 176

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 176

tccaccataa aagatgtgga aa

22

<210> 177

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 177

cctccactca tgtcccatTT

20

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 178

tcaagccatg cttttctgtg

20

<210> 179

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 179

attttagcca atggcctcct

20

<210> 180

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 180

cactggtttg cagcgataga

20

<210> 181

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 181

attggtgaat tgggattgga

20

<210> 182

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 182

gaagcccacc acagtaggaa

20

<210> 183

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 183

tggatcgaat ccaaacacaa

20

<210> 184

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 184

ctggcttgtc tgcaaacctt

20

<210> 185

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 185

ctccatcatc caccacctt

20

<210> 186

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 186

ggaaggccag caagtgtaga

20

<210> 187

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 187

gccagaaaat tgaccctgag

20

<210> 188

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 188

cagctgctca gcgatcttac

20

<210> 189

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 189

ccctcatcgt gtcaagtcaa

20

<210> 190

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 190

agcatcaaac agaccaacc

20

<210> 191

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 191

ttgtttggct gggatagagg

20

<210> 192

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 192

gctctgtccg gatagctacg

20

<210> 193

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 193

ccctacaagg tgaacccaga

20

<210> 194

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 194

ggagtagcag ctggttcctg

20

<210> 195

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 195

tgacaacctg tgccatttcg

20

<210> 196

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 196

ccacacaaga cctatgatag a

21

<210> 197

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 197

ctcaaggatg acgtgggttt

20

<210> 198

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 198

gatttcctct ggccaattca

20

<210> 199

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 199

aactacgcag ccttggtcag

20

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 200

tggcagttga gttgggtaaa

20

<210> 201

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 201

gatgttacca atcccgttcg

20

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 202

tgggctccta tatgcggtta

20

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 203

tgctttcaac gtggagtttg

20

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 204

ccccataattt ggtgttccag

20

<210> 205

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 205

caaaatgctg ctggtgaaga

20

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 206

gcctctgtca gctcaaggac

20

<210> 207

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 207

gtcgtcagca gccatgttta

20

<210> 208

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 208

ggcagggtcaa aggtcatgtt

20

<210> 209

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 209

gggatgcttg aagatggaaa

20

<210> 210

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 210

cagtggcacc ataggcataa

20

<210> 211

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 211

gctcctgggt agaactgcac

20

<210> 212

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 212

gccctgttgg tatcttgtgg

20

<210> 213

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 213

ttgaggaaat cctggacctg

20

<210> 214

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 214

ttgaggtctc gcaccttctt

20

<210> 215

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 215

ctgatggagt acgcaaagca

20

<210> 216

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 216

ctcgagaatg tcaggggtgt

20

<210> 217

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 217

acagagcctc gcctttgc

18

<210> 218

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 218

cacgatggag gggaagac

18

<210> 219

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 219

gagctgggaa gattcgaaca

20

<210> 220

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 220

agagatacgc aggtgcaggt

20

<210> 221

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 221

gagatctcgc cggctttac

19

<210> 222

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 222

cgcgagagtc aaagatctcc

20

<210> 223

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 223

cagctccagg aaatgctagt g

21

<210> 224

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 224

ggtggaactt gggatcagac

20

<210> 225

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 225

gaggggaaggc ttagccatgt

20

<210> 226

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 226

ttgaagggtc catgcctatc

20

<210> 227

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 227

gcctgtaagt acggggacaa

20

<210> 228

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 228

ctcttcagcg ttgtggatga

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/00-9/99, C12Q1/00-70, G01N33/00-98,
C07K1/00-19/00, A61K31/00-48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroshi Okabe et al., "Genome-wide Analysis of Gene Expression in Human Hepatocellular Carcinomas Using cDNA Microarray: Identification of Genes Involved in Viral Carcinogenesis and Tumor Progression.", Cancer Research, Vol.61, (2001), pages 2129 to 2137	10
A	Xiang-Ru Xu et al., "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver.", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.98, No.26, (2001), pages 15089 to 15094	10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 December, 2004 (07.12.04)

Date of mailing of the international search report
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012425

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Norio IIZUKA et al., "Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepato-cellular carcinoma after curative resection.", The Lancet, Vol.361, No. 9361, 15 March, 2003 (15.03.03), pages 923 to 929	10
A	Sin Tim Cheung et al., "Identify Metastasis-associated Genes in Hepatocellular Carcinoma through Clonality Delineation for Multinodular Tumor.", Cancer Research, Vol.62, (2002), pages 4711 to 4721	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012425

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012425

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions according to claim 1 to 9 relate to "a method of evaluating cancer" which is recognized as a method of substantially judging pathological conditions of humans or the like by measuring a gene expression amount in the human body and collecting data for a medicinal (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012425

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

purpose, i.e., to find out a disease or understand health conditions. Thus, the inventions according to claims 1 to 9 pertain to diagnostic methods.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/09, C12N 15/12, C12Q 1/68, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/00 ~ 15/90, C12N 1/00 ~ 9/99, C12Q 1/00 ~ 70, G01N 33/00 ~ 98, C07K 1/00 ~ 19/00, A61K 31/00 ~ 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hiroshi Okabe, et al., "Genome-wide Analysis of Gene Expression in Human Hepatocellular Carcinomas Using cDNA Microarray: Identification of Genes Involved in Viral Carcinogenesis and Tumor Progression." Cancer Research, Vol.61, (2001), p.2129-2137	10

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.12.2004

国際調査報告の発送日

25.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Xiang-Ru Xu, et al., "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, No. 26, (2001), p.15089-15094	10
A	Norio Iizuka, et al., " Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection." The Lancet, Vol. 361, No. 9361, (15 March 2003), P. 923-929	10
A	Siu Tim Cheung, et al., "Identify Metastasis-associated Genes in Hepatocellular Carcinoma through Clonality Delineation for Multinodular Tumor." Cancer Research, Vol.62, (2002), p.4711-4721	10

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 1-9 に係る発明は「癌の評価方法」である。これは、病気の発見、健康状態の認識等の医療目的で、人間の身体の遺伝子の発現量を計測して資料を収集し、実質的に、人間の病状等について判断する方法であると認める。
したがって、請求の範囲 1-9 に係る発明は、診断方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。